

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. April 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/032943 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/728**, A61P 19/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010822

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. September 2003 (30.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 46 340.9 4. Oktober 2002 (04.10.2002) DE(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **WOHLRAB, David [DE/DE]**; Mörikestrasse 13, 06118 Halle (DE).(74) Anwalt: **PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR**; Mozarstrasse 17, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KB, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Titel: COMBINATION PREPARATION OF HYALURONIC ACID AND AT LEAST ONE LOCAL ANESTHETIC AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: KOMBINATIONSPRÄPARAT AUS HYALURONSÄURE UND MINDESTENS EINEM, LOKALANÄSTHETIKUM UND DESSEN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a combination preparation comprising an active substance A selected among the group that consists of hyaluronic acid and the salts and fragments thereof, at least one active substance B selected among the group of local anesthetics and the derivatives thereof, and other optional additives. Said combination preparations are used for the medical treatment of degenerative and traumatic diseases of all joints, the treatment of articular cartilage damages and cartilage bone damages, lesions of a meniscus or an intervertebral disk such as arthrosis, articular rheumatism, osteochondrolysis, flake fractures, and meniscus lesions, and the treatment of skin modifications or mucosal modifications, also according to cosmetic aspects.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Kombinationspräparat bestehend aus einem Wirkstoff A aus der Gruppe Hyaluronsäure, deren Salzen und Spaltprodukten, mindestens einem Wirkstoff B aus der Gruppe der Lokalanästhetika und deren Derivaten sowie gegebenenfalls weiteren Zusatzstoffen. Diese Kombinationspräparate finden Verwendung für die medizinische Behandlung von degenerativen und traumatischen Erkrankungen aller Gelenke, zur Behandlung von Gelenkknorpel- und Knorpelknochendefekten sowie Meniskus- und Bandscheibenläsionen wie z.B. Arthrose, Gelenkrheumatismus, Osteochondrosis dissecans, flake fractures, Meniskusläsionen sowie zur Behandlung von Haut- bzw. Schleimhautveränderungen auch unter kosmetischen Gesichtspunkten.

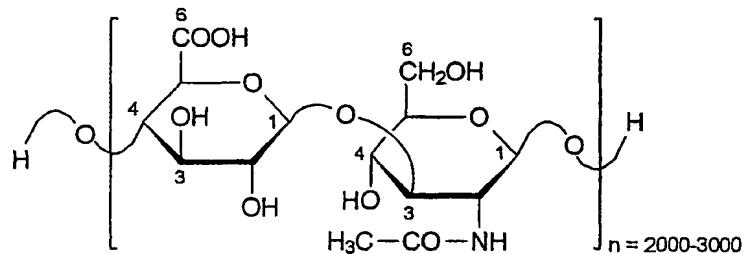
WO 2004/032943 A1

Kombinationspräparat aus Hyaluronsäure und mindestens
einem Lokalanästhetikum und dessen Verwendung

Die Erfindung betrifft ein Kombinationspräparat bestehend aus einem Wirkstoff A aus der Gruppe Hyaluronsäure, deren Salzen und Spaltprodukten, mindestens einem Wirkstoff B aus der Gruppe der Lokalanästhetika und deren Derivaten sowie gegebenenfalls weiteren Zusatzstoffen. Diese Kombinationspräparate finden Verwendung für die medizinische Behandlung von degenerativen und traumatischen Erkrankungen aller Gelenke, zur Behandlung von Gelenkknorpel- und Knorpelknochendefekten sowie Meniskus- und Bandscheibenläsionen wie z.B. Arthrose, Gelenkrheumatismus, Osteochondrosis dissecans, flake fractures, Meniskusläsionen sowie zur Behandlung von Haut- bzw. Schleimhautveränderungen auch unter kosmetischen Gesichtspunkten.

Der chemische Name für Hyaluronsäure ist Hyaluronan.
Seine chemische Struktur entspricht der Formel

5
10



15
20
25

Ungeachtet der positiven klinischen Erfahrungen mit hochmolekularer Hyaluronsäure bzw. deren Salzen (Masse $> 1 \times 10^6$ Dalton) ist die Kenntnis über den Wirkmechanismus unvollständig. Der bisherige Wissensstand weist intraartikulär applizierte Hyaluronsäure als ein Schmier- und Gleitmittel aus (A. Lussier et al. (1996); J Rheumatol. 23, 1579-1585; D. Scale et al. (1994); Current Therapeutic Research. 55, 220-232; M. Wobig et al. (1998) Clinical Therapeutics. 20, 410-423). Des Weiteren wurde nachgewiesen, daß Hyaluronsäure intraartikulär entzündungshemmende Eigenschaften besitzt (K.W.Marshall (1997) Today's Therapeutic Trends. 15, 99-108; K.W.Marshall (2000) Curr. Opin.Rheumatol. 12, 468-474).

30
35

Die Arthrose beginnt mit einer initialen Schädigung des Knorpelgewebes aufgrund verschiedener Ursachen. Dies hat eine reaktive Synovialitis zur Folge, welche ihrerseits sowohl pathologische Veränderungen der Synovialflüssigkeit, d.h. Abnahme der Konzentration und des Molekulargewichtes der Hyaluronsäure, sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren bewirkt. Dies führt zu einer sekundären Knorpelschädigung und damit letztendlich zur Arthrose, welche neben dem Knorpel-

gewebe auch alle anderen Gelenkstrukturen betrifft
(J.P.Pelletier et al. (1993) J Rheumatol. 20, 19-24).

5 Es ist bekannt, daß intraartikulär applizierte Hyaluronsäure zur Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit, zur Schmerzreduktion, zur Hemmung der Entzündungsprozesse und unter in vitro Bedingungen zur Steigerung der Chondrozyten-Proliferation führt (K.Kawasaki et al. (1999) Cell Physiol. 179, 142-148; D. Wohlrab et al. (2000) hylan news. 2; 2-5).

10 Ausgehend hiervon war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Kombinationspräparat bereitzustellen, daß in vielfältiger Form applizierbar ist und bei dem die Wirkstoffe gezielt retardiert freigesetzt werden können.

15 20 Diese Aufgabe wird durch das Kombinationspräparat mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Die Verwendung des Kombinationspräparats wird in Anspruch 15 beschrieben. Die weiteren abhängigen Ansprüche zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf.

25 30 Erfindungsgemäß wird ein Kombinationspräparat bereit gestellt, daß aus einem Wirkstoff A aus der Gruppe Hyaluronsäure, deren physiologischen Salzen und Spaltprodukten, mindestens einem Wirkstoff B aus der Gruppe der Lokalanästhetika und deren Derivaten sowie gegebenenfalls weiteren Zusatzstoffen besteht.

35 Es wurde festgestellt, daß durch die erhebliche Molekülgröße der Hyaluronsäure ($1-6 \times 10^6$ Da) diese mehrfach gespalten werden muss, bevor sie den intraartikulären Raum verlassen und abgebaut bzw. in Knorpelgewebe eingebaut werden kann. Diese Spaltungsprozesse nehmen in Abhängigkeit von der Molmasse der Hyaluron-

säure Stunden bis mehrere Tage in Anspruch.

Aufgrund dieser im Vergleich zu anderen niedermolekularen Substanzen, wie es z.B. Lokalanästhetika sind,
5 verlängerten intraartikulären Verweildauer eignet sich hochmolekulare Hyaluronsäure, deren Salze oder Spaltprodukte als Träger für Substanzen, welche ohne derartige Bindung an ein Trägermolekül eine deutlich verkürzte intraartikuläre Verweildauer und damit eine
10 sehr kurze Wirkdauer aufweisen.

Als galenische Formulierung kommen sämtliche aus dem Stand der Technik bekannten Formulierungen in Frage. Hierzu zählen insbesondere intraartikulär, intradiscal, subcutan, intracutan oder topisch anwendbare galenische Formulierungen.
15

Vorzugsweise werden als Wirkstoff A Verbindungen aus der Gruppe Hyaluronsäure, deren Salzen und Spaltprodukte und als Wirkstoff B Verbindungen aus der Gruppe der Lokalanästhetika und deren Derivaten Verbindungen gewählt, die untereinander eine chemische oder physikalische Bindung aufweisen, wobei der Wirkstoff B retardiert freisetzbar ist. Der pH-Wert der Formulierung ermöglicht dabei eine optimale Bindung zwischen den beiden Wirkstoffen und die Freigabe des Wirkstoffes B kann über die Veränderung des pH-Wertes des Umgebungsmediums gesteuert werden.
20
25

30 Vorzugsweise ist der Wirkstoff A in dem Kombinationspräparat in einer Konzentration zwischen 0,001 und 5 Gew.-% oder bevorzugt zwischen 0,2 und 2,0 Gew.-% enthalten. Der Wirkstoff B ist vorzugsweise in einer Konzentration zwischen 0,001 und 20 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,001 und 5,0 Gew.-% enthalten.
35 Weiterhin können in dem Kombinationspräparat weitere

Zusatzstoffe enthalten sein. Hierzu zählen beispielsweise Substanzen mit Radikalfänger-Eigenschaften, insbesondere Tocopherolderivate oder Ascorbinsäurederivate. Des Weiteren können Substanzen des hyalinen Knorpelgewebes eingesetzt werden, insbesondere Glucosaminsulfatderivate oder Chondroitinsulfatderivate. Weiterhin können Substanzen mit steroidaler und corticosteroidaler Wirkung eingesetzt werden, insbesondere Glucocorticoide. Als Zusatzstoffe kommen weiterhin nicht-steroidale Antiphlogistika, die auch als Anti-Rheumatika bezeichnet werden, insbesondere Indometacin, Dichlorphenac oder Salicylsäurederivate und Analgetica, insbesondere Oxicame, Anilin- oder Anthranilsäurederivate in Frage. Das Kombinationspräparat kann als Zusatzstoff ebenfalls Substanzen mit hemmender Wirkung auf die Prostaglandinsynthese, insbesondere Lipoxygenase-Hemmer, Cyclooxygenase-Hemmer und Phospholipase-A2-Hemmer. Ebenso kommen als Zusatzstoffe Wachstumsfaktoren, insbesondere Retinol oder Bone Morphogenetic Proteins (BMP's), Vitamine, insbesondere Vitamin A, C, B12 oder Biotin, Antioxidantien, insbesondere Flavonoide oder Glutathion, und Substanzen mit wasserbindenden Eigenschaften, insbesondere Harnstoff oder Arginin in Frage. Das Kombinationspräparat kann als beliebige galenische Formulierung, z.B. als Lösung, Suspension, Emulsion, Paste, Salbe, Gel, Creme, Lotion, Lack, Puder, Seife, tensidhaltiges Reinigungspräparat, Öl, Lippenstift, Lippenpflegestift, Mascara, Eyeliner, Lidschatten, Rouge, Puder-, Emulsions- oder Wachs-Make ups, Sonnenschutz-, Prä- und Aftersun-Präparate oder als Spray hergestellt werden. Die Anwendung des Kombinationspräparats kann sowohl am Menschen als auch an Tieren erfolgen. Die erfin-

nungsgemäßen Kombinationspräparate können sowohl in der Human- und Veterinärmedizin sowie in der Kosmetik angewendet werden.

5 Die Anwendungsgebiete der Kombinationspräparate betreffen die human- und veterinärmedizinische Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von degenerativen oder traumatischen Gelenkerkrankungen und Gelenkfunktionsstörungen, Gelenkknorpel- und Knorpelknochendefekten, Meniskus- und Bandscheibenerkrankungen.
10 Hierzu zählen beispielsweise die Steigerung der Chondrozyten-Proliferation, die Stabilisierung und/oder Regeneration von Gelenkstrukturen, insbesondere des Gelenkknorpels und der Menisci, die Steigerung der 15 Gelenkbeweglichkeit und die Hemmung von Entzündungsprozessen.

20 Ebenso kann das Kombinationspräparat allerdings auch zur Behandlung von Haut- oder Schleimhautveränderungen sowohl unter medizinischen wie kosmetischen Gesichtspunkten eingesetzt werden.

25 Erfnungsgemäß wird ebenso die Verwendung mindestens eines Wirkstoffes A aus der Gruppe Hyaluronsäure, deren Salzen und Spaltprodukten in Kombination mit mindestens einem Wirkstoff B aus der Gruppe der Lokalanästhetika und deren Derivaten zur Herstellung eines Arzneimittels zur human- und veterinärmedizinischen Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Gelenkerkrankungen und Gelenkfunktionsstörungen beansprucht.
30

35 Die Erfnung soll anhand der folgenden Beispiele und Figuren erläutert werden, ohne sie darauf zu beschränken.

Beispiel 1:

Physiologische Verträglichkeit der erfindungsgemäßen
galenischen Formulierungen

5

Herstellung:

Lidocainhydrochlorid (Universitätsapotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und Hyaluronsäure (Aqua Biochem, Dessau) (MG $1,5 \times 10^6$ Da) lagen primär in Pulverform vor. Zur Herstellung von 2%-igen Stammlösungen wurden entsprechende Mengen in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) gelöst und anschließend steril filtriert. Zur Herstellung eines Lidocain-Hyaluronsäure-Gemisches wurden diese Stammlösungen zu gleichen Teilen vermischt. Die Substanzzugabe zur Zellkultur erfolgte am 10. Kulturtag beim Mediumwechsel. Hier wurden entsprechende Mengen der Testsubstanzen (Stammlösungen) zugegeben, so daß eine jeweilige Endkonzentration von 5×10^{-5} mmol/l erreicht wurde.

10

Präparation des biologischen Materials:

Die Untersuchungen erfolgten an humanen Chondrozyten, welche aus arthrotisch verändertem Kniegelenksknorpel isoliert wurden. Das Knorpelgewebe entstammte den bei der Implantation von Kniestalendoprothesen resizierten femoralen Gelenkflächen. Es wurde ausschließlich arthrotisch verändertes Knorpelgewebe von drei verschiedenen Spendern ohne bekannte relevante Nebenerkrankungen, insbesondere ohne rheumatoide Arthritis, verwandt.

15

Die intraoperativ gewonnenen Knochen-Knorpelfragmente wurden zunächst in steriles L15 Medium (Seromed, Berlin) als Transportmedium überführt. Anschließend erfolgte unter sterilen Bedingungen die Ablösung des

20

25

30

35

5 Knorpelgewebes vom subchondralen Knochen mittels Skalpell sowie eine scharfe Durchtrennung des Gewebes in ca. 1mm³ große Stücke. Die enzymatische Isolierung der Chondrozyten aus den Knorpelstücken erfolgte mittels Pronase und Kollagenase A (Boehringer Mannheim) über eine Zeitspanne von 16 Stunden.

10 Versuchsbedingungen:
Die isolierten Chondrozyten wurden in 24-er well Platten in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) unter Zusatz verschiedener Antibiotika bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank als Monolayerkultur kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Nach 10 Kulturtagen erfolgte letztmalig ein Mediumwechsel und hierbei die Zugabe der jeweiligen Testsubstanzen, welche im Kulturmedium gelöst wurden. Zusätzlich wurde jeweils eine unbehandelte Chondrozytenpopulation als Kontrolle mitgeführt.

15 20 Versuchsdurchführung:
Die Messung des ³H-Thymidineinbaus als Maß für die DNA-Syntheseleistung erfolgte 24, 48 bzw. 72 Stunden nach Substanzzugabe. Am Ende der Kulturdauer wurde zu der Zellkultur je well 20 µl ³H-methyl-Thymidin (spezifische Aktivität 60,3 Ci/mmol; American Radiolabelled Chemicals Inc., St. Louis, USA) zugegeben. Zwei Stunden nach ³H-Thymidinzugabe wurde das Medium aus den Kammern mit Hilfe eines Cell Harvesters (Berthold GmbH, Bad Wildbad) abgesaugt. Jede Kulturkammer wurde mit 200 µl Trypsin beschickt und nach 20 Minuten wurde die Zellsuspension über einen Filter abgesaugt. Anschließend erfolgte die Messung der Radioaktivität der Zellen im Filterpapier mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers (WINSPECTRAL 1414, Wallace-ADL GmbH, Freiburg, Deutschland).

Die Ergebnisse für die physiologische Verträglichkeit der erfindungsgemäßen galenischen Formulierungen sind in Fig. 1 dargestellt.

5 Fig. 1 zeigt den Einfluss von Hyaluronsäure (Hys) ($1,5 \times 10^{-6}$ Da, 5×10^{-5} mmol/l), Lidocain (Lido) (5×10^{-5} mmol/l) und Hyaluronsäure-Lidocain-Gemisch (Hys+Lido) (je 5×10^{-5} mmol/l) auf den 3 H-Thymidineinbau von in vitro kultivierten humanen Chondrozyten (N=3) nach 48 h Inkubationszeit. Jeder Messwert ist der Mittelwert von 8 Einzelmessungen.

Beispiel 2:

15 Beeinflussung der Proliferation humaner Chondrozyten durch Lidocain

Herstellung:

20 Lidocainhydrochlorid (Universitätsapotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) lag primär in Pulverform vor. Dieses wurde in entsprechender Menge in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) gelöst, so daß eine Endkonzentration von 0,1 mmol/l Lidocain vorlag. Anschließend erfolgte die Sterilfiltration. Die Substanzzugabe zur Zellkultur erfolgte ab dem 2. Kulturtag bei jedem Mediumwechsel. Hier wurden entsprechende Mengen der Testsubstanzen (Stammlösungen) zugegeben, so daß eine jeweilige Endkonzentration von 5×10^{-5} mmol/l erreicht wurde.

30 Präparation des biologischen Materials
Die Präparation des Knorpelgewebes und der daraus isolierten Chondrozyten erfolgte analog den in Beispiel 1 dargestellten Methoden.

35

Versuchsbedingungen:

Die isolierten Chondrozyten wurden in 24-er well Platten in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) unter Zusatz verschiedener Antibiotika bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank als Monolayerkultur kultiviert. 5 Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Ab dem ersten Mediumwechsel erfolgte die Zugabe des Lidocains im Zellkulturmedium in einer Konzentration 0,1 mmol/l. Zusätzlich wurde jeweils eine unbehandelte Chondrozytenpopulation als Kontrolle mitgeführt. Die Kulturdauer betrug 6, 12 bzw. 18 Tage. 10

Versuchsdurchführung:

Die Messung des ^3H -Thymidineinbaus als Maß für die 15 DNA-Syntheseleistung erfolgte am jeweiligen Ende der Kulturdauer analog dem im Beispiel 1 dargestellten Verfahren. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Fig. 2 dargestellt.

20 Fig. 2 zeigt den Einfluß von Lidocain (0,1 mmol/l) auf den ^3H -Thymidineinbau von in vitro kultivierten humanen Chondrozyten (N=6). Substanzzugabe am 2. Kulturtag. Jeder Messwert ist der Mittelwert von 8 Einzelmessungen

25

Beispiel 3

Die optimale Bindung des Lokalanästhetikums bzw. der 30 Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen an Hyaluronsäure und/oder den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie von Spaltprodukten dieser Verbindungen am Beispiel des Lidocains.

Tabelle 1 zeigt nachfolgend den Anteil an freiem Lidocain bei unterschiedlichen Lidocainkonzentrationen (Konz. Hyaluronsäure=0,05%)

Konz.		0,025	0,05	0,01	0,2	0,3	0,4	0,5	
Freies Lidocain [%]		pH 6,9	54	55	70	71	87	89	93
		pH 7,9	34	81	79	82	89	91	105

5

Experimentelle Bedingungen:

3D CE system der Fa. Hewlett Packard mit fused silica Kapillare 40,0 (48,5) cm mit Innendurchmesser 50 μm ,
10 Temp.: 25°C, Druckinjektion: 50 mbar x sec,
Spannung: +30 kV, UV-Detektion: kathodenseitig bei
15 $\lambda = 195 \text{ nm}$ und 200 nm, Injektionszeit: 200 sec.
Durch die Injektionszeit wurden 7,5 cm der Kapillare mit der Probe gefüllt, um eine optimale Trennung der Peaks zu erreichen.

Anhand der elektrophoretischen Frontalanalyse konnte
gezeigt werden, daß eine Wechselwirkung zwischen Hyaluronsäure (Hys) und Lidocain auftritt. Wenn gleiche
20 prozentuale Anteile von Hys und Lidocain bzw. wenn prozentual weniger Lidocain als Hys vorliegt, wird der größte Anteil an Lidocain an Hys gebunden. Der Mechanismus der Wechselwirkung beruht auf einer Einlagerung des Lidocains in die helixartigen Knäuel der Hys, da auch bei pH-Wert 7,9, wenn Lidocain zur Hälfte undissoziiert vorliegt (pKs-Wert = 7,9 in Anwesenheit von Hys). Ausserdem sind ionische Bindungen an
25

der Wechselwirkung beteiligt, da bei pH 6,9, wenn Lidocain vollständig dissoziiert vorliegt, weniger freies Lidocain detektiert werden konnte (außer bei einer Lidocainkonz. = 0,025%).

5

Beispiel 4

10 Retardierte Freisetzung des Lokalanästhetikums bzw. der Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindung aus Formulierungen, die Hyaluronsäure und/oder den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie von Spaltprodukten dieser Verbindungen enthalten, am Beispiel des Lidocains.

15 Tabelle 2 zeigt nachfolgend den Flux des Lidocains durch eine Dialysemembran mit und ohne Hyaluronsäure (Hys) im Donorkompartiment

pH-Wert		3,1	6,0	6,5	6,9	7,7	9,0
Flux [mg h ⁻¹ cm ⁻²]	Lidocain	0,32	0,355	0,315	0,42	0,35	0,09
	Lidocain + Hys	0,27	0,256	0,234	0,27	0,23	0,04
Differenz [%] Flux _{Lidocain} - Flux _{Lidocain+Hys}		15,6	27,8	25,8	35,7	34,3	55,6

20

Experimentelle Bedingungen:

Diffusionszelle mit Diffusionsfläche (A) = 15,9 cm² und einer Natrium-Cellulose-Xanthogenat-(Nephrophan)Dialyse Membran, Volumen (V) des Donor-(DK) und des Akzeptorkompartiments (AK) = 20 ml, Diffusionszeit = 4 h, Temp.: 37°C, Konzentration der Hys im Donorkompartiment = 0,25% und die Anfangskonzentration des Lidocains im Donorkompartiment = 0,05%.

Berechnung des Fluxes:

$$5 \quad \text{Flux} = \frac{C_{AK} V_{AK}}{A t}$$

Dabei sind:

C_{AK} = Konzentration des Lidocains im AK und
 t = Diffusionszeit.

10 Anhand der Resultate, die in der Dialysezelle erhalten wurden, zeigte sich, daß der Flux des Lidocains durch diese Porenmembran bei Anwesenheit der Hys im Donorkompartiment erheblich reduziert wurde. Am

15 stärksten ausgeprägt ist der Effekt bei pH = 9,0, dort liegt Lidocain weitgehend undissoziiert vor. Dies bestätigt die Resultate, die in Beispiel 3 beschrieben wurden, daß der Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Lidocain und Hys auf einer Einlagerung des

20 Lidocains in die helixartigen Knäuel der Hys beruht. Aber auch bei pH-Werten zwischen 6,9 und 7,7 ist eine starke Reduzierung des Lidocainfluxes zu beobachten.

Das bestätigt, daß auch ionogene Bindungen an der Interaktion zwischen Lidocain und Hys beteiligt sind. 25 Verschiebt man den pH-Wert in den sauren Bereich z.B. nach pH = 3,1, dort liegt die Hys weitgehend undissoziiert vor, wird der Lidocainflux weniger stark reduziert. Das zeigt deutlich, daß auch ionogene Bindungen an der Wechselwirkung beteiligt sind.

30 Insgesamt kann festgestellt werden, daß ein starker Retardeffekt hinsichtlich der Freisetzung des Lidocains aus dem Lidocain-Hys-Komplex erzielt werden kann. Dadurch kann die Wirkung des Lidocains in biologischen Systemen (z.B. im Kniegelenk) erheblich verlängert werden.

Patentansprüche

1. Kombinationspräparat bestehend aus mindestens einem Wirkstoff A aus der Gruppe Hyaluronsäure, deren Salzen und Spaltprodukten, mindestens einem Wirkstoff B aus der Gruppe der Lokalanästhetika und deren Derivaten sowie gegebenenfalls weiteren Zusatzstoffen.
5
- 10 2. Kombinationspräparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirkstoffe A und B chemisch oder physikalisch aneinander gebunden sind, und dass Wirkstoff B retardiert freisetzbar ist.
15
- 20 3. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff A in einer Konzentration zwischen 0,001 und 5 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,2 und 2 Gew.-% enthalten ist.
25
4. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff B in einer Konzentration zwischen 0,001 und 20 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,001 und 5,0 Gew.-% enthalten ist.
30
5. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Substanzen mit Radikalfängereigenschaften, insbe-

sondere Tocopherolderivate und/oder Ascorbinsäurederivate, enthalten sind.

- 5 6. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Substanzen des hyalinen Knorpelgewebes, insbesondere Glucosaminsulfatderivate und/oder Chondroitinsulfatderivate, enthalten sind.
- 10 7. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Substanzen mit steroidaler oder corticosteroidaler 15 Wirkung, insbesondere Glucocorticoide, enthalten sind.
- 20 8. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff nichtsteroidaler Antiphlogistika, insbesondere Indometacin, Dichlorphenac oder Salicylsäurederivate, enthalten sind.
- 25 9. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Analgetika, insbesondere Oxicame, Anilin- oder Anthranilsäurederivate, enthalten sind.
- 30 10. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Sub-

stanzen mit hemmender Wirkung auf die Prostaglandinsynthese, insbesondere Lipoxygenasehemmer, Cyclooxygenasehemmer und Phospholipase-A2-Hemmer, enthalten sind.

5

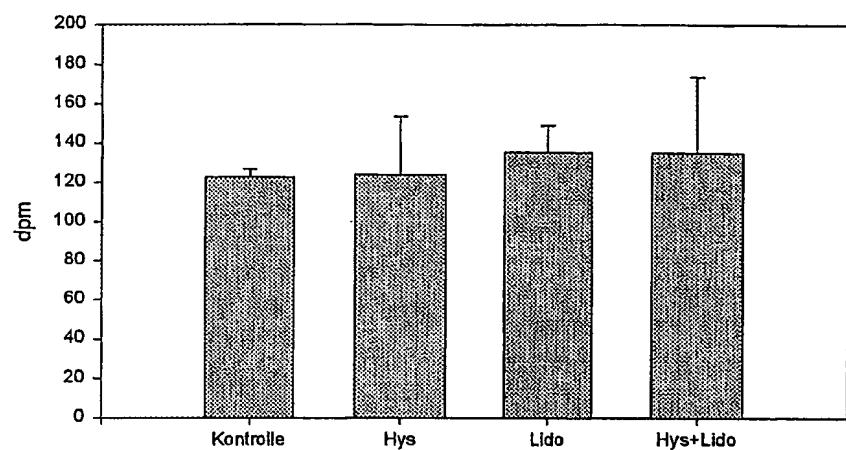
11. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Wachstumsfaktoren, insbesondere Retinol oder Bone Morphogenetic Proteins (BMP's), enthalten sind.
12. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Vitamine, insbesondere Vitamin A, C, B12 oder Biotin, enthalten sind.
13. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Antioxydantien, insbesondere Flavonoide oder Glutathion, enthalten sind.
14. Kombinationspräparat nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Zusatzstoff Substanzen mit wasserbindenden Eigenschaften, insbesondere Harnstoff oder Arginin, enthalten sind.
15. Verwendung von Hyaluronsäure, deren Salzen und Spaltprodukte in Kombination mit mindestens ei-

nem Wirkstoff aus der Gruppe der Lokalanästhetika und deren Derivate zur Herstellung eines Arzneimittels zur human- und veterärmedizinischen Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von 5 degerenativen oder traumatischen Gelenkerkrankungen und Gelenkfunktionsstörungen.

16. Verwendung nach Anspruch 15 zur human- und veterärmedizinischen Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Gelenkknorpel- und Knorpelknochendefekten. 10
17. Verwendung nach Anspruch 15 zur human- und veterärmedizinischen Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Meniskus- und Bandscheibenerkrankungen. 15
18. Verwendung nach Anspruch 15 zur Steigerung der Chondrozytenproliferation. 20
19. Verwendung nach Anspruch 15 zur Stabilisierung und/oder Regeneration von Gelenkstrukturen, insbesondere des Gelenkknorpels und des Meniskus. 25
20. Verwendung nach Anspruch 15 zur Steigerung der Gelenkbeweglichkeit.
21. Verwendung nach Anspruch 15 zur Hemmung von Entzündungsprozessen. 30

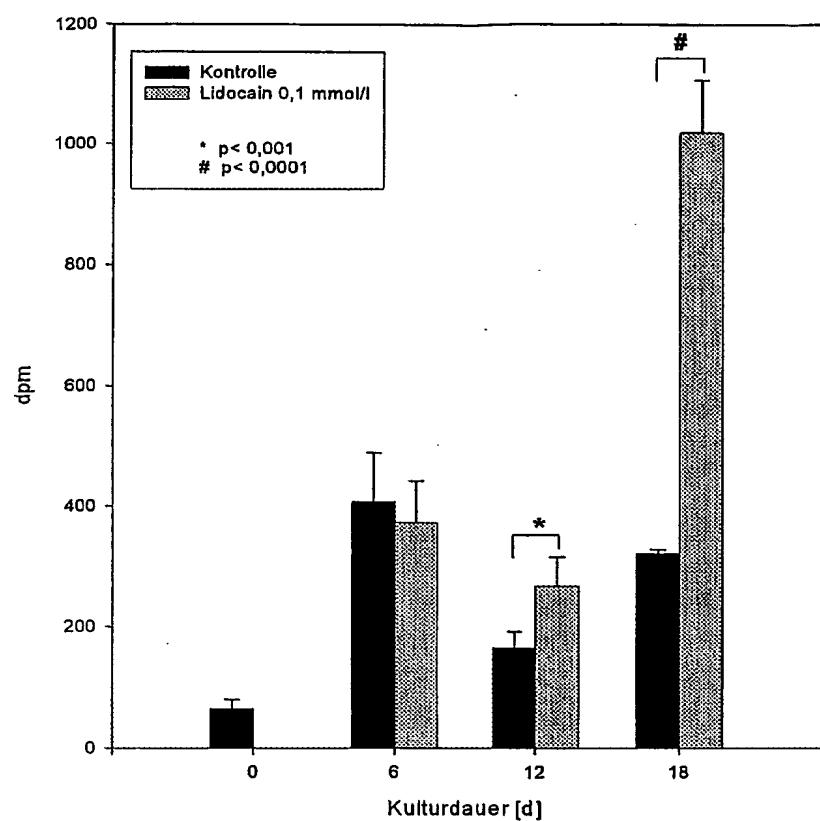
22. Verwendung nach Anspruch 15 zur Behandlung von
Haut- bzw. Schleimhautveränderungen.

Figure 1



BEST AVAILABLE COPY

Figur 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/10822A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/728 A61P19/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 224 857 B1 (SILVESTRINI BRUNO ET AL) 1 May 2001 (2001-05-01) column 3, line 23,24; claim 1	1-22
X	US 5 972 326 A (SALAMONE JOSEPH C ET AL) 26 October 1999 (1999-10-26) column 11, line 6-9 column 9, line 2-37; claims 1,4,7,9	1-14

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report
30 January 2004	06/02/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Beyss, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 03/10822

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6224857	B1	01-05-2001	IT PD960254 A1 AU 712927 B2 AU 4470097 A BR 9713486 A CA 2268967 A1 EP 0956026 A1 JP 2001503042 T WO 9817285 A1 KR 2000049281 A PL 332873 A1 TR 9900860 T2	17-04-1998 18-11-1999 15-05-1998 11-04-2000 30-04-1998 17-11-1999 06-03-2001 30-04-1998 25-07-2000 25-10-1999 21-06-1999
US 5972326	A	26-10-1999	US 5759532 A US 5612027 A AU 6471698 A BG 103806 A BR 9808282 A CN 1251979 T EA 2004 B1 EE 9900413 A EP 1027015 A1 HU 0001818 A2 ID 23917 A JP 2001516258 T NO 994485 A NZ 337654 A PL 335801 A1 SK 127099 A3 TR 9902253 T2 WO 9841171 A1 AP 850 A AU 707013 B2 AU 5555796 A BG 62598 B1 BG 101960 A BR 9608441 A CA 2216417 A1 CN 1181703 A CZ 9703264 A3 DE 822822 T1 EA 790 B1 EE 9700286 A EP 0822822 A1 ES 2116950 T1 HU 9802665 A2 JP 3314085 B2 JP 10510293 T NO 974808 A NZ 306875 A OA 10744 A PL 322820 A1 SK 140297 A3 TR 9701192 T1 WO 9632951 A1 US 5766580 A US 5965152 A	02-06-1998 18-03-1997 12-10-1998 28-04-2000 16-05-2000 03-05-2000 22-10-2001 17-04-2000 16-08-2000 28-10-2000 25-05-2000 25-09-2001 16-11-1999 27-04-2001 22-05-2000 11-07-2000 21-12-1999 24-09-1998 14-06-2000 01-07-1999 07-11-1996 31-03-2000 30-04-1998 17-02-1999 24-10-1996 13-05-1998 16-09-1998 03-09-1998 24-04-2000 15-06-1998 11-02-1998 01-08-1998 28-06-1999 12-08-2002 06-10-1998 15-12-1997 29-06-1999 11-12-2002 16-02-1998 11-01-1999 21-02-1998 24-10-1996 16-06-1998 12-10-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen
PCT/EP 03/10822

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K31/728 A61P19/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
X	US 6 224 857 B1 (SILVESTRINI BRUNO ET AL) 1. Mai 2001 (2001-05-01) Spalte 3, Zeile 23,24; Anspruch 1	1-22
X	US 5 972 326 A (SALAMONE JOSEPH C ET AL) 26. Oktober 1999 (1999-10-26) Spalte 11, Zeile 6-9 Spalte 9, Zeile 2-37; Ansprüche 1,4,7,9	1-14

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'I' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

*'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

30. Januar 2004

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

06/02/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Beyss, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentzeichen

PCT/EP 03/10822

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6224857	B1	01-05-2001		IT PD960254 A1 AU 712927 B2 AU 4470097 A BR 9713486 A CA 2268967 A1 EP 0956026 A1 JP 2001503042 T WO 9817285 A1 KR 2000049281 A PL 332873 A1 TR 9900860 T2	17-04-1998 18-11-1999 15-05-1998 11-04-2000 30-04-1998 17-11-1999 06-03-2001 30-04-1998 25-07-2000 25-10-1999 21-06-1999
US 5972326	A	26-10-1999		US 5759532 A US 5612027 A AU 6471698 A BG 103806 A BR 9808282 A CN 1251979 T EA 2004 B1 EE 9900413 A EP 1027015 A1 HU 0001818 A2 ID 23917 A JP 2001516258 T NO 994485 A NZ 337654 A PL 335801 A1 SK 127099 A3 TR 9902253 T2 WO 9841171 A1 AP 850 A AU 707013 B2 AU 5555796 A BG 62598 B1 BG 101960 A BR 9608441 A CA 2216417 A1 CN 1181703 A CZ 9703264 A3 DE 822822 T1 EA 790 B1 EE 9700286 A EP 0822822 A1 ES 2116950 T1 HU 9802665 A2 JP 3314085 B2 JP 10510293 T NO 974808 A NZ 306875 A OA 10744 A PL 322820 A1 SK 140297 A3 TR 9701192 T1 WO 9632951 A1 US 5766580 A US 5965152 A	02-06-1998 18-03-1997 12-10-1998 28-04-2000 16-05-2000 03-05-2000 22-10-2001 17-04-2000 16-08-2000 28-10-2000 25-05-2000 25-09-2001 16-11-1999 27-04-2001 22-05-2000 11-07-2000 21-12-1999 24-09-1998 14-06-2000 01-07-1999 07-11-1996 31-03-2000 30-04-1998 17-02-1999 24-10-1996 13-05-1998 16-09-1998 03-09-1998 24-04-2000 15-06-1998 11-02-1998 01-08-1998 28-06-1999 12-08-2002 06-10-1998 15-12-1997 29-06-1999 11-12-2002 16-02-1998 11-01-1999 21-02-1998 24-10-1996 16-06-1998 12-10-1999

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)

BEST AVAILABLE COPY